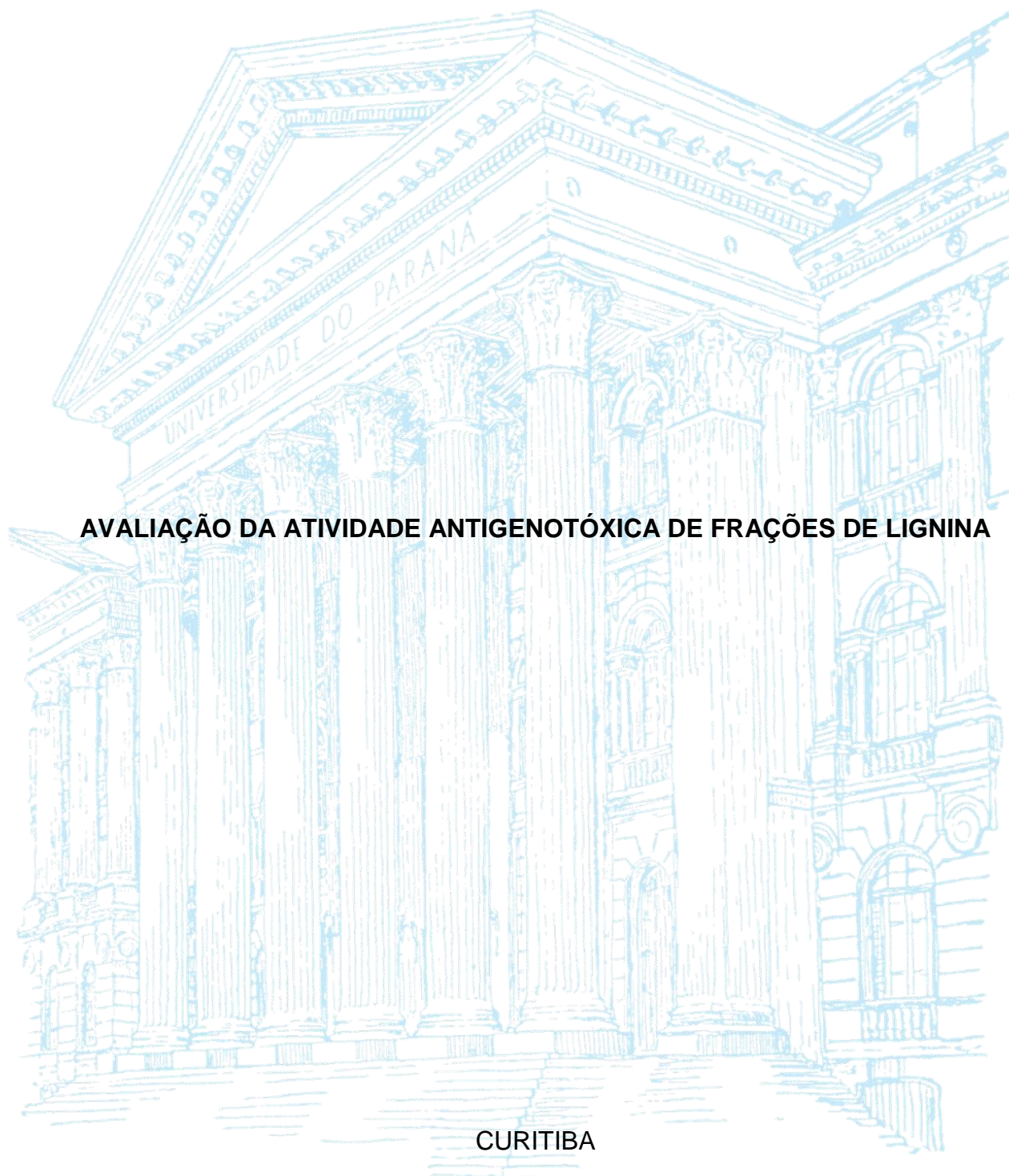


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EMANOELA LUNDGREN THÁ



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIGENOTÓXICA DE FRAÇÕES DE LIGNINA

CURITIBA

2018

EMANOELA LUNDGREN THÁ

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIGENOTÓXICA DE FRAÇÕES DE LIGNINA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Morais Leme

Co-orientadora: Me. Isisdoris Rodrigues de Souza

CURITIBA

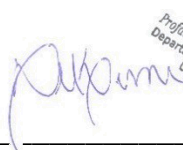
2018

TERMO DE APROVAÇÃO

EMANOELA LUNDGREN THÁ

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIGENOTÓXICA DE FRAÇÕES DE LIGNINA

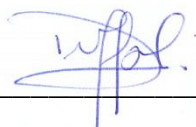
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dra. Daniela Morais Leme
Departamento Genética - UFPR
UFPR nº 204563

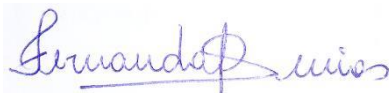
Prof. Dra. Daniela Morais Leme

Orientadora – Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi

Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná



Prof. Dra. Fernanda Fogagnoli Simas

Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 14 de dezembro de 2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha co-orientadora Isisdoris Rodrigues de Souza, pois sem sua ajuda, a realização desse trabalho não seria possível. Obrigada por estar ao meu lado nos momentos difíceis e por ter parte em cada um dos resultados apresentados aqui.

À minha mãe Karen e ao Bruno Paparella por estarem sempre presentes, por acreditarem em mim, por todo o apoio emocional e toda a força que me deram ao longo desse árduo ano. Vocês foram essenciais para eu chegar onde cheguei.

Ao meu pai Celso, minha irmã Rafaela, minha tia Katja, aos demais familiares e amigos pelo apoio e pela força.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental (Departamento de Genética – UFPR), em especial à Viviana Stephanie Costa Gagosian, Isisdoris Rodrigues de Souza e Taynah Vicari, pelos ensinamentos, pela ajuda nos experimentos e pelo apoio.

Ao Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência da UFPR (CTAF-UFPR) pelo uso dos equipamentos adquiridos com recursos do edital Pro-equipamentos (CAPES) e Pro-Infra (INEP).

Aos membros da banca, Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi e Profa. Dra. Fernanda Fogagnoli Simas por aceitarem avaliar o meu trabalho.

Por fim, gostaria de agradecer à minha orientadora, Profa. Dra. Daniela Morais Leme, pela confiança, por acreditar no meu potencial quando eu mesma não acreditei e por me ajudar todas as vezes que precisei. Obrigada por me dar a oportunidade de fazer meu Trabalho de Conclusão de Curso sob sua orientação.

"Life need not be easy, provided only that it is not empty."

Lise Meitner

RESUMO

A lignina é um polímero fenólico que confere impermeabilidade e estabilidade estrutural à parede celular de plantas. Diversos estudos já demonstraram sua capacidade antioxidante. O sequestro ou a prevenção da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) leva à proteção de lesões oxidativas no DNA. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi investigar a capacidade antigenotóxica de frações de lignina provenientes do processo Kraft em modelo de células hepáticas *in vitro* (linhagem celular de hepatocarcinoma humano – HepG2) pela técnica do ensaio Cometa (versões padrão e oxidativa) utilizando dois indutores de danos no DNA (*i.e.*, genotóxicos) conhecidos (Metil metanosulfonato – MMS e peróxido de hidrogênio – H₂O₂). O potencial genotóxico das frações de lignina também foi avaliado a fim de determinar sua segurança. A capacidade protetora contra danos no DNA (atividade antigenotóxica) não foi observada para as frações de lignina testadas. Ao contrário, ao avaliar a genotoxicidade da lignina, constatou-se que esse polímero foi capaz de gerar a oxidação do DNA. No teste do DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazil), as frações haviam se mostrado potentes antioxidantes; contudo, esse ensaio possui certas limitações, visto que acessa o sequestro de radicais livre apenas no ambiente testado, de forma que sua relevância para sistemas biológicos torna-se incerta. Além disso, compostos fenólicos podem possuir atividade pró e antioxidante dependendo das condições avaliadas. Em altos níveis, a geração de ROS pode acarretar em danos a macromoléculas, como o DNA, o que pode levar a diversas consequências aos sistemas biológicos, sendo a genotoxicidade considerada o primeiro sistema de alerta a carcinógenos DNA-reativos. Desta forma, nossos dados alertam quanto ao potencial nocivo da lignina quanto a indução de danos oxidativos no DNA.

Palavras-chave: Lignina. Genotoxicidade. Ensaio Cometa. Quebras de fita de DNA. Oxidação de bases.

ABSTRACT

Lignin is a phenolic polymer that gives impermeability and structural stability to plant cell walls. Several studies have already demonstrated its antioxidant capacity. Reactive oxygen species (ROS) scavenge or prevention of its formation can lead to the protection of oxidative lesions in DNA. Therefore, this study aimed to investigate the antigenotoxic capacity of lignin fractions derived from the Kraft process in an *in vitro* liver cell model (human hepatocarcinoma cell line - HepG2) using the Comet assay (alkaline and oxidative versions) and two known genotoxics (Methyl methanesulfonate - MMS and hydrogen peroxide - H₂O₂). The genotoxic potential of lignin fractions was also evaluated in order to determine their safety. Protective capacity against DNA damage (antigenotoxic activity) was not observed for the lignin fractions tested. On the contrary, when assessing the genotoxicity of lignin, it was found that this polymer was able to generate DNA oxidation. In the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay, the fractions had been shown as potent antioxidants; however, this assay has certain limitations, since it accesses free radical scavenge only in the tested environment, thus its relevance to biological systems becomes uncertain. In addition, phenolic compounds may possess pro and antioxidant activity depending on the conditions evaluated. At high levels, the generation of ROS can lead to damage to macromolecules, such as DNA, which can lead to several consequences for biological systems, and genotoxicity is considered the first alert system of DNA-reactive carcinogens. Hence, our data shows the harmful potential of lignin for the induction of oxidative DNA damage.

Keywords: Lignin. Genotoxicity. Comet assay. DNA strand breaks. DNA base oxidation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVO GERAL	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3 JUSTIFICATIVA	9
4 REVISÃO DE LITERATURA	10
4.1 MATERIAL GENÉTICO E ALTERAÇÕES NO DNA	10
4.2 AGENTES ANTIGENOTÓXICOS	12
4.3 LIGNINA E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS	12
4.3.1 Atividade antioxidante	14
4.3.2 Atividade antigenotóxica	14
4.3.3 Toxicidade	17
4.4 MODELO DE HEPATOCARCINOMA HUMANO <i>IN VITRO</i> (HEPG2)	17
5 MATERIAS E MÉTODOS	18
5.1 MATERIAIS	18
5.2 MÉTODOS	19
5.2.1 Cultivo celular	19
5.2.2 Teste do MTT	19
5.2.3 Tratamentos para a avaliação do potencial antigenotóxico e genotóxico da lignina	21
5.2.4 Ensaio Cometa	21
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6.1 TESTE DO MTT	24
6.2 ENSAIO COMETA	26
6.2.1 Genotoxicidade	26
6.2.2 Antigenotoxicidade	29
7 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1 INTRODUÇÃO

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é a molécula portadora da informação genética e, portanto, contém informações essenciais que controlam os processos fisiológicos celulares, sendo fundamental para a vida dos organismos (ALBERTS, et al., 2014). Modificações na estrutura do DNA podem resultar em alterações na informação genética contida nessa molécula com consequente comprometimento da fisiologia normal das células (RAVANAT; DOUKI, 2016).

O DNA está constantemente exposto à agentes químicos e físicos (e.g., radiação), endógenos e exógenos, que podem danificar essa macromolécula e comprometer a informação genética nela contida. As células possuem mecanismos de reparo para esses danos, contudo, quando eles falham, ocorrem as mutações, que são lesões permanentes e herdáveis no material genético (ALBERTS, et al., 2014).

Mutações estão associadas com várias patologias humanas, como o câncer. Sabe-se que mutações em células somáticas desempenham um papel fundamental no início do câncer e em outros estágios do processo de carcinogênese (DE FLORA; FERGUSON, 2005). Além disso, há evidências de que as alterações do DNA também podem contribuir para a patogênese de outras condições, como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (TZORTZAKI et al., 2012), aterosclerose (PULLIERO et al., 2015), anemia aplástica (MUFTI; MARSH, 2018) e doença de Parkinson (PROUKAKIS; HOULDEN; SCHAPIRA, 2013).

O aumento da incidência de doenças com a patologia relacionada a mutações levou à busca de agentes que possam prevenir a indução de danos no DNA (DE FLORA; FERGUSON, 2005). A antigenotoxicidade refere-se ao uso de agentes naturais ou sintéticos com propriedade de prevenir ou evitar a progressão do dano genético (CRISTÓBAL-LUNA et al., 2018). Entretanto, tendo em vista a crescente preocupação pública em relação exposição humana e ambiental aos compostos sintéticos (PODEIN et al., 2010), a avaliação de possíveis benefícios à saúde humana de compostos de origem vegetal, como a lignina, recebeu maior atenção (MIKULÁŠOVÁ; KOŠÍKOVÁ, 2003).

A lignina é um composto complexo presente na parede celular das plantas e é um dos materiais poliméricos mais abundantes e importantes dentre os recursos naturais. Diferentes estudos já atribuíram à lignina possíveis efeitos benéficos à saúde, como atividade antioxidante, antitumoral, antimutagênica e antimicrobiana

(UGARTONDO; MITJANS; VINARDELL, 2009; NAIK; ROZMAN; BHAT, 2013; WANG et al., 2015; BARAPATRE et al., 2016; SUNTHORNVARABHAS; LIENGPRAYOON; SUWONSICHON, 2017; ATHINARAYANAN et al., 2018). As pesquisas sobre a lignina avançaram nos últimos anos (VINARDELL; MITJANS, 2017) e há grandes esforços para encontrar diferentes aplicabilidades para esse polímero barato e abundante, o qual apresenta um grande potencial nas mais diversas áreas (WATKINS et al., 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a lignina em relação à capacidade protetora contra danos no DNA, devido a sua atividade antioxidante já determinada (teste do DPPH), utilizando um modelo hepático humano *in vitro* (linhagem celular de hepatocarcinoma humano - HepG2). Como objetivo secundário, o presente trabalho avaliou o potencial genotóxico da lignina para determinar a segurança desse composto em sistema biológico caso apresente potencial uso hepatoprotetor contra danos DNA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade de frações de lignina pelo teste do MTT em células HepG2, a fim de definir as frações a serem testadas e suas concentrações de estudo (i.e., não citotóxicas) para a avaliação dos potenciais antígeno-tóxico e genotóxico;
- Avaliar o potencial antígeno-tóxico e genotóxico das frações de lignina pelo ensaio do Cometa na versão alcalina para a detecção de quebras de fita simples (SSB), quebras de fita dupla (DSB), SSB associadas a sítios incompletos de reparo e sítios álcali-lábeis; e na versão alcalina modificada para detecção de danos oxidativos (hOGG1).

3 JUSTIFICATIVA

O crescente número de contaminantes ambientais reconhecidos como mutágenos, i.e. compostos com capacidade de danificar o DNA, tem levantado sérias

preocupações quanto à qualidade da saúde humana. Nesse contexto, estudos de bioprospecção de compostos com capacidade protetora contra danos no DNA têm sido estimulados. A lignina já se demonstrou uma substância promissora na proteção do DNA de diferentes células como fibroblastos humanos primários (VH10) e células de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) em avaliações por meio do ensaio Cometa e do *SOS Chromotest* (SLAMEŇOVÁ et al., 1999; KOŠÍKOVÁ et al., 2002; LÁBAJ; SLAMENOVA; KOSIKOVA, 2003). Assim, o presente trabalho buscou avaliar se esses resultados poderiam ser reproduzidos células hepáticas humanas, visto que a prevenção de lesões genéticas no fígado é muito relevante, uma vez que esse órgão é um importante alvo de agentes genotóxicos por ser o principal metabolizador de xenobióticos do corpo humano (CARNEY; SETTIVARI, 2013).

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 MATERIAL GENÉTICO E ALTERAÇÕES NO DNA

A estrutura dos seres vivos e seus processos biológicos são baseados principalmente em proteínas e a informação genética para a síntese dessas proteínas está contida no DNA (GRIFFITHS, et al. 2016). A vida depende da habilidade de células armazenarem, recuperarem e traduzirem essas informações genéticas necessárias para a geração e manutenção de um ser vivo, entretanto, o DNA é um constante alvo de lesões por inúmeros fatores (ALBERTS, et al. 2014).

Os danos no material genético são denominados de mutações quando causam alterações irreversíveis e hereditárias no DNA. Essas lesões persistem quando escapam da detecção pelos mecanismos de reparo de DNA, quando ocorrem erros no processo de reparo ou quando os mecanismos de reparo estão sobrecarregados por múltiplos danos. Após a replicação celular, esses danos se tornam permanentes no genoma e são herdados por todas as células-filhas (SCHRADER, 2003).

O material genético pode sofrer lesões a partir de agentes físicos, químicos, biológicos e endógenos:

Agentes físicos. Radiações ionizantes (e. g. raios X, raios gama, partículas alfa) produzem quebras de fita simples e dupla e uma grande diversidade de bases nitrogenadas danificadas (KLAASSEN; WATKINS, 2012), como por exemplo timidina e citosina glicóis, 8-oxoguanina, hipoxantina, entre outras (RAVANAT; DOUKI, 2016)

A luz ultravioleta produz principalmente dímeros de pirimidina-ciclobutano e o fotoproduto (6-4)-pirimidina-pirimidona [(6-4)PPs] (KLAASSEN; WATKINS, 2012).

Agentes químicos. Podem causar a formação de adutos de DNA, danos oxidativos e alterações na ultraestrutura do DNA como *crosslinking*, quebra da fita de DNA, rearranjos cromossômicos e deleções (POIRIER, 2004). Como exemplo pode-se citar os agentes alquilantes, como o metil metanosulfonato (MMS), o qual adiciona grupos metil no nitrogênio da posição 7 na guanina, gerando a N7-metilguanina, e no nitrogênio 3 da adenina, gerando a N3-metiladenina, ambas sendo suscetíveis a quebra da ligação N-glicosídica, gerando sítios apurínicos (CHATTERJEE; WALKER, 2017). Há, ainda, os agentes químicos que induzem danos oxidativos, como a fumaça do cigarro, a qual possui inúmeros radicais livres de oxigênio, e alguns praguicidas que induzem o estresse oxidativo e diminuem a atividade de enzimas antioxidantes como a catalase (MENA; ORTEGA; ESTRELA, 2009). Lesões oxidativas no DNA podem gerar mutações de ponto, deleções, inserções ou translocações cromossômicas (KLAUNIG et al., 2011).

Agentes biológicos. Exemplos desses agentes são o vírus do papiloma humano (HPV), que pode causar carcinoma de colo de útero, vulva, vagina, pênis, ânus, cavidade oral, orofaringe e tonsilas, e a bactéria *Helicobacter pylori*, importante causa de câncer gástrico e linfoma de tecido linfoide associado à mucosa (MALT) (BOUVARD et al., 2009).

Agentes endógenos. Esses agentes produzem centenas de danos no DNA por célula diariamente, como bases alteradas e sítios AP (apurínicos/apirimidínicos). Os danos são causados principalmente pelas espécies reativas de oxigênio (ROS - *Reactive Oxygen Species*), as quais são geradas naturalmente pelos processos celulares (KLAASSEN; WATKINS, 2012). Um exemplo de ROS é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é gerado pela superóxido dismutase (SOD) a partir do ânion superóxido (O_2^-), que é um produto intermediário da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias (KALOGERIS; BAO; KORTHUIS, 2014). Apesar de ser menos reativo que outras ROS, o H_2O_2 tem um papel importante na geração de lesões oxidativas no material genético uma vez que se difunde facilmente através de membranas biológicas, o que permite que atinja rapidamente outros compartimentos celulares, como o núcleo (MARKKANEN, 2017).

4.2 AGENTES ANTIGENOTÓXICOS

Com o aumento da expectativa de vida, a qual quase dobrou no último século, doenças degenerativas crônicas emergiram como as principais causas de morte. Várias dessas doenças compartilham mecanismos comuns como determinantes patogênicos, tais como danos ao DNA. Dessa forma, surgiu no meio científico um esforço coletivo para identificar métodos para a prevenção desses danos, que consistem em evitar ou minimizar exposições a fatores de risco reconhecidos, ou na administração de agentes antigenotóxicos e antimutagênicos para prevenir a indução de danos ou inibir a ação de genotoxícos (DE FLORA; FERGUSON, 2005).

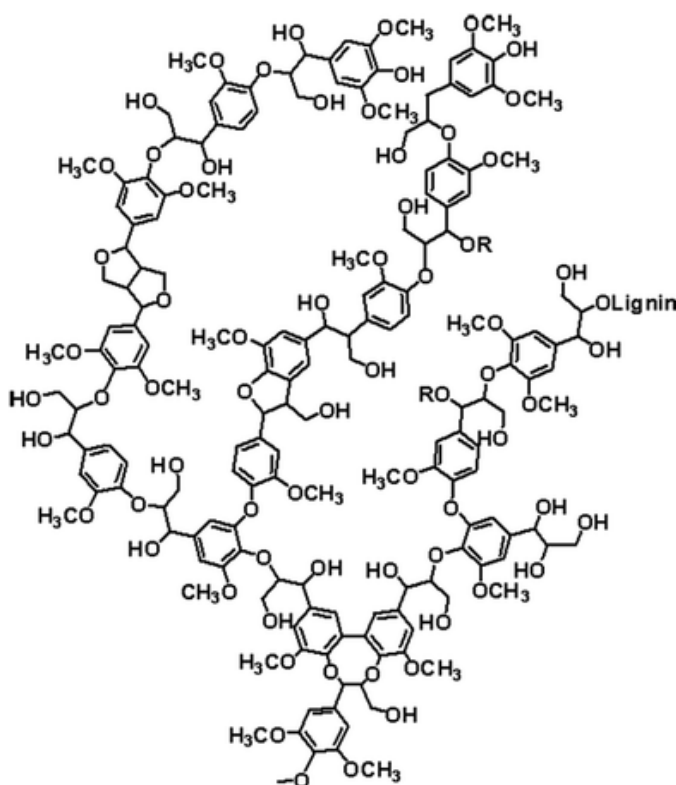
A busca por agentes antigenotóxicos está concentrada essencialmente em compostos de origem natural. Roberto et al. (2016) demonstraram que extratos etanólicos de própolis verde brasileiro (EEGP) e de *Baccharis dracunculifolia* (EEBD) foram capazes de diminuir o danos genéticos provocados por MMS em células de hepatoma de rato (HTC). O óleo de *Carapa guianensis* apresentou potencial medicinal como agente antigenotóxico, modulando a mutagenicidade causada pela mitomicina C e pela ciclofosfamida em medula óssea de camundongos (LEMES et al., 2017). Os componentes catequina, galocatequina e rutina das frutas de *Paliurus spina-christi* Mill apresentaram a capacidade de proteger o DNA de danos oxidativos na linhagem celular V79, derivada de pulmão de hamster (ZOR et al., 2017). Além dos citados aqui, há ainda uma grande variedade de compostos naturais que possuem atividades antigenotóxicas já comprovadas (AMKISS et al., 2013; PRAPHASAWAT; MUNKONG, 2017; ZAREV et al., 2017; FERNÁNDEZ-BEDMAR; ANTER; ALONSO MORAGA, 2018; MAKHUELE et al., 2018)

4.3 LIGNINA E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

A lignina é um polímero fenólico complexo presente nas paredes celulares dos vegetais (MIKULÁŠOVÁ; KOŠÍKOVÁ, 2003; UGARTONDO; MITJANS; VINARDELL, 2008; UGARTONDO; MITJANS; VINARDELL, 2009), o qual é fundamental para a integridade estrutural e impermeabilidade da parede celular, permitindo o transporte de água e solutos pelo sistema vascular. Além disso, a lignina promove uma barreira física contra fitopatógenos e outros estresses ambientais (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003; FIGUEIREDO et al., 2018). Devido à sua natureza polimérica

complexa e ao grau de acoplamento aleatório envolvido no arranjo da macromolécula, a estrutura química precisa da lignina não é conhecida (VINARDELL; MITJANS, 2017), apenas de alguns de seus fragmentos (FIGURA 1).

FIGURA 1 - ESTRUTURA REPRESENTATIVA DE FRAGMENTO DA LIGNINA CONTENDO OS PADRÕES DE LIGAÇÃO MAIS IMPORTANTES.



FONTE: Lignoworks (2016)

Após a celulose, a lignina é o segundo polímero mais abundante na biomassa e o principal polímero composto por unidades aromáticas. Pode ser obtida por diferentes processos de extração da madeira, de plantas anuais como o trigo, ou de resíduos agrícolas como o bagaço de cana. Anualmente, são produzidas mais de 70 milhões de toneladas de lignina no mundo (LAURICHESSE; AVÉROUS, 2016) e, dessa forma, sua abundância a torna uma fonte muito atrativa de produtos químicos (KOŠÍKOVÁ et al., 2002). Entretanto, 95% da lignina produzida é queimada para a produção de energia, enquanto que apenas 5% é usada para fins comerciais, como aditivos, dispersantes, ligantes ou surfactantes (LAURICHESSE; AVÉROUS, 2016).

Quanto às suas propriedades farmacológicas, vários estudos já atribuíram à lignina atividade antioxidante, antigenotóxica, antitumoral, antiviral, antibacteriana, antiparasitária, imunomodulatória e entre outras (UGARTONDO; MITJANS;

VINARDELL, 2009; MARTÍNEZ; MITJANS; VINARDELL, 2012; NAIK; ROZMAN; BHAT, 2013; WANG et al., 2015; BARAPATRE et al., 2016; SUNTHORNVARABHAS; LIENGPRAYOON; SUWONSICHON, 2017; ATHINARAYANAN et al., 2018).

4.3.1 Atividade antioxidante

A produção excessiva de ROS está relacionada a processos inflamatórios e degenerativos, bem como ao desenvolvimento de diversas patologias incluindo diabetes mellitus, aterosclerose, pancreatite aguda, envelhecimento, cirrose alcoólica, hipertensão, hiperlipidemia, dano renal e câncer (TEDESCO et al., 2000; UGARTONDO; MITJANS; VINARDELL, 2009; MARTÍNEZ; MITJANS; VINARDELL, 2012). A lignina atua no sequestro de radicais livres como o ânion superóxido (O_2^-) e radicais hidroxila (OH^\cdot), estabilizando as reações induzidas pelo oxigênio e suas espécies reativas (DIZHBITE et al., 2004; UGARTONDO; MITJANS; VINARDELL, 2009), propriedade que está relacionada à presença de grupos fenólicos em sua estrutura que atuam como estabilizadores de reações induzidas por esses radicais livres (MARTÍNEZ; MITJANS; VINARDELL, 2012).

Estudos que avaliaram a capacidade de inibição da hemólise de eritrócitos humanos por AAPH [dicloridrato de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano)] mostraram que a capacidade antioxidante da lignina proveniente do bagaço de cana é semelhante ao antioxidante conhecido epicatequina (VINARDELL; UGARTONDO; MITJANS, 2008; UGARTONDO; MITJANS; VINARDELL, 2008). No teste do DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazil), que é um método colorimétrico de reatividade química baseado na redução desse radical livre por um substrato com atividades antioxidantes, frações de lignina isoladas da biomassa de *Borassus flabellifer* apresentaram um alto poder de sequestro de radicais livre, de maneira dose-dependente (ATHINARAYANAN, et al. 2018).

4.3.2 Atividade antigenotóxica

O estresse oxidativo está associado à indução de vários tipos de modificações de DNA, portanto, a capacidade antioxidante da lignina pode prevenir lesões oxidativas no material genético (MARTÍNEZ; MITJANS; VINARDELL, 2012). Além disso, pesquisas já demonstraram que a lignina também pode proteger o DNA de

outras lesões. O polímero foi capaz de proteger o material genético contra o agente alquilante metil-nitro-nitrosoguanidina (MNNG) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas linhagens celulares humanas VH10 e Caco-2 e na linhagem celular V79, de hamster (SLAMEŇOVÁ et al., 1999; KOŠÍKOVÁ et al., 2002; LÁBAJ; SLAMEŇOVÁ; KOŠÍKOVÁ, 2003). Segundo Lábaj et al. (2007), a lignina apresentou efeito protetor no DNA de hepatócitos de rato *in vitro* e *ex vivo* submetidos a três diferentes genotoxícos: H_2O_2 para indução de SSBs, azul de metileno excitado por luz visível para indução de lesões oxidativas e 1,2-dibromo-3-cloropropano para indução de sítios álcali-lábeis. Lábaj e colaboradores (2004) demonstraram que a lignina foi capaz de proteger o DNA de células de testículo e linfócitos de rato *in vitro* e *ex vivo* expostas ao H_2O_2 e azul de metileno excitado por luz visível. No teste do micronúcleo em medula óssea de camundongo, a lignina apresentou capacidade genoprotetora na exposição ao agente alquilante ciclofosfamida (NAIK; ROZMAN; BHAT, 2013). Os dados de antígenotoxicidade da lignina citados estão compilados na TABELA 1.

TABELA 1 - RESUMO DOS ESTUDOS DE ANTIGENOTOXICIDADE DA LIGNINA.

Tipo de lignina	Ensaio	Sistema-teste	Exposição à lignina	Indutor	Exposição ao indutor	Enzima para detecção de danos oxidativos	Referência
Lignina hidrossolúvel livre de enxofre derivada de hidrolisado de madeira	Ensaio Cometa	Células VH10 e V79	Pré-tratamento de 2 h	MNNG (2 µg/mL)	2 h no poço	ENDOIII e FPG	SLAMEŇOVÁ et al. (1999)
				H ₂ O ₂ (100 µM)	5 min nas lâminas do Cometa antes da lise		
Lignina derivada do processo Kraft; lignina obtida por pré-hidrólise de madeira	Ensaio Cometa	Células Caco-2, VH10 e V79	Pré-tratamento (tempo não citado)	MNNG (13,6 µM)	não citado	-	KOŠÍKOVÁ et al. (2002)
				H ₂ O ₂ (100 µM)			
Lignina hidrossolúvel livre de enxofre derivada de hidrolisado de madeira; lignina derivada do processo Kraft; lignina obtida por pré-hidrólise da madeira por <i>Geotrichum klebahnii</i>	Ensaio Cometa	Células Caco-2 e V79	Pré-tratamento de 2 h	MNNG (0,5; 1, e 2 µg/ml)	30 min em PBS ou 2 h em DMEM, ambos no poço	ENDOIII e FPG	LÁBAJ; SLAMEŇOVÁ; KOŠÍKOVÁ (2003)
Lignina hidrossolúvel livre de enxofre derivada de hidrolisado de madeira	Ensaio Cometa	Células testiculares e linfócitos de rato <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	Pré-tratamento de 2 h (<i>in vitro</i>); Dieta de 21 dias com 2, 4 e 8% de lignina (<i>ex vivo</i>)	H ₂ O ₂ (25, 50, 75, 100, 200 µM)	tratamentos nas lâminas do Cometa antes da lise (tempo não citado)	ENDOIII e FPG (apenas para o azul de metileno excitado por luz visível)	LÁBAJ, et al. (2004)
				Azul de metileno excitado por luz visível			
Lignina hidrossolúvel livre de enxofre derivada de hidrolisado de madeira	Ensaio Cometa	Hepatócitos de rato <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	Pré-tratamento de 2 h (<i>in vitro</i>); Dieta de 10 g de lignina/100 g de peso corporal (<i>ex vivo</i>)	H ₂ O ₂ (200 e 400 µM)	5 min nas lâminas do Cometa antes da lise	ENDOIII e FPG (apenas para o azul de metileno excitado por luz visível)	LÁBAJ, et al. (2007)
				Azul de metileno excitado por luz visível 3,125 × 10 ⁻⁵ mol/L	2 e 3 min nas lâminas do Cometa antes da lise		
Lignina isolada de licor negro	Teste do Micronúcleo	Medula óssea de camundongos	Dieta de 50, 100 e 200 mg/kg por 2 dias	Ciclofosfamida (50 mg/kg)	Injeção intraperitoneal 1 h após a última dose de lignina	-	NAIK; ROZMAN; BHAT (2013)

FONTE: A Autora (2018)

4.3.3 Toxicidade

Em estudo sobre sua citotoxicidade em queratinócitos humanos (HaCaT) e fibroblastos murinos (3T3) pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro, a lignina se mostrou citotóxica apenas em concentrações muito elevadas ($> 400 \mu\text{g/mL}$) (UGARTONDO; MITJANS; VINARDELL, 2008). No teste de Ames, quatro tipos de lignina derivadas da madeira não apresentaram efeitos genotóxicos nas concentrações testadas (até $500 \mu\text{g/placa}$), já dois tipos de lignina isoladas do milho foram tóxicas nas concentrações 125, 225 e $500 \mu\text{g/placa}$, e ligninas derivadas de alterações hidrotermais e de palha apresentaram toxicidade na maior concentração ($500 \mu\text{g/placa}$), o que impossibilitou a avaliação da mutagenicidade nesses casos (MIKULÁŠOVÁ; KOŠÍKOVÁ, 2003). Vinardell, Ugartondo e Mitjans (2008) demonstraram que diferentes tipos de lignina testados não provocaram irritabilidade ocular ou dérmica em coelhos albinos *New Zealand*. Em células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs), diferentes tipos de lignina apresentaram citotoxicidade elevada em concentrações altas ($\geq 300 \mu\text{g/mL}$) nos ensaios do MTT e de coloração laranja de acridina/brometo de etídio. As células hMSCs expostas à lignina apresentaram alterações morfológicas, densidade celular reduzida e mudanças morfológicas nucleares, incluindo fragmentação do DNA e condensação nuclear (ATHINARAYANAN, et al. 2018).

4.4 MODELO DE HEPATOCARCINOMA HUMANO *IN VITRO* (HEPG2)

O fígado é o maior órgão metabolizador do corpo humano (CARNEY; SETTIVARI, 2013). Antes que possam ser efetivamente eliminados, os xenobióticos passam por uma série de modificações químicas, que incluem as reações de fase I e II no fígado, o que torna esse órgão um importante alvo dos xenobióticos (CASTELL et al., 2006) e os hepatócitos, um importante modelo de estudo na toxicologia (CARNEY; SETTIVARI, 2013).

Os hepatócitos primários são células metabolicamente muito competentes (CASTELL et al., 2006), contudo, as linhagens celulares derivadas de hepatocarcinoma apresentam grandes vantagens dada a sua disponibilidade, fácil manuseio, fenótipo estável e vida útil ilimitada (DONATO; JOVER; GÓMEZ-LECHÓN, 2013).

A linhagem celular humana HepG2 foi isolada a partir de um hepatocarcinoma por Aden et al. (1979), sendo uma das linhagens celulares hepáticas mais comumente empregadas. Essas células sintetizam e secretam várias proteínas que são características das células humanas normais e sua morfologia celular se assemelha às células do parênquima hepático. As células HepG2 também expressam diversas enzimas metabolizadoras de xenobióticos, incluindo muitos citocromos P450. No entanto, os níveis de expressão da maioria dos transportadores nucleares e de enzimas metabólicas são mais de 50 vezes menores em relação aos hepatócitos *in vivo* ou em cultura primária (CARNEY; SETTIVARI, 2013).

As células HepG2 são amplamente utilizadas para avaliar os efeitos tóxicos de uma ampla variedade de produtos químicos e fármacos. Além disso, têm sido empregadas em testes de genotoxicidade, pois essas células expressam enzimas metabolizadoras necessárias para a ativação de pró-mutágenos. As células HepG2 exibem danos aumentados no DNA e apoptose após a exposição à aflatoxina B1, sendo condizentes com o fígado *in vivo*. Além disso, o potencial genotóxico de diferentes hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e aminas aromáticas heterocíclicas observadas em células HepG2 correlacionam-se com suas atividades carcinogênicas em roedores. Diversas classes de outros carcinogênicos ambientais, tais como nitrosaminas e corantes azoicos (*Disperse Red 1*, *Disperse Orange 1* e *Disperse Red 13*) são identificadas como genotóxicas usando células HepG2 (CARNEY; SETTIVARI, 2013).

Dessa forma, as células HepG2 são um importante modelo na Toxicologia, o qual pode ser empregado com êxito em estudos sobre danos no DNA.

5 MATERIAS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

As frações de lignina [F3, F5, F7 e F9, todas à 10 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO)], foram cedidas pelo Dr. Washington Luiz Esteves Magalhães, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Unidade Florestas, Colombo-PR. As frações foram obtidas por precipitação sequencial por acidificação do licor negro proveniente do processo Kraft, como descrito por Lourençon et al. (2015).

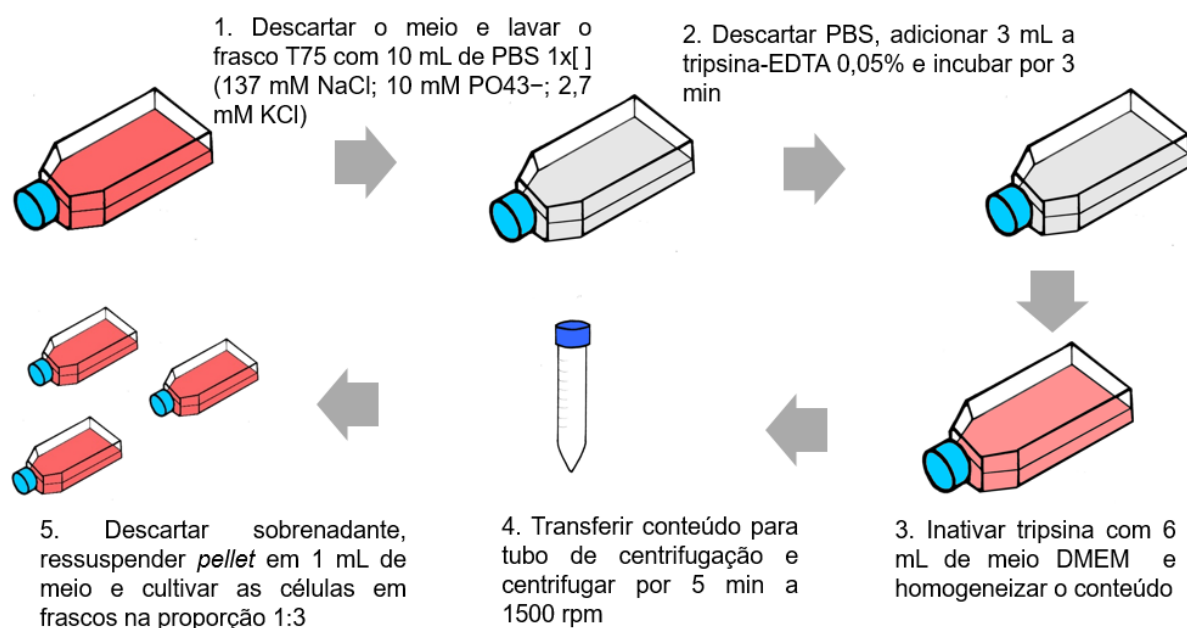
Células HepG2 (*Human hepatocellular carcinoma cells*, ATCC® HB-8065™), cedidas pela Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), foram utilizadas como modelo *in vitro* hepático humano.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Cultivo celular

Células HepG2 foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), contendo antibióticos (penicilina 1 U/mL e estreptomicina 1 µg/mL), em atmosfera úmida a 37°C e 5% CO₂. Subculturas celulares (FIGURA 2) foram realizadas quando as garrafas atingiram cerca de 80% de confluência.

FIGURA 2 - ESQUEMA DO SUBCULTIVO DE CÉLULAS HEPG2



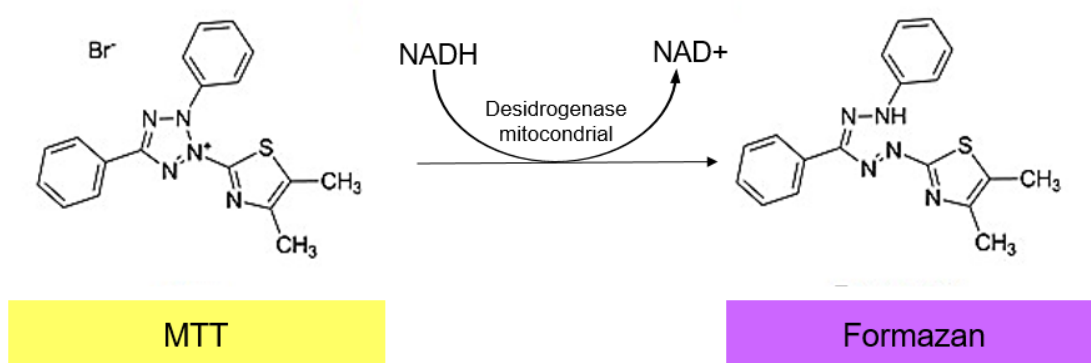
FONTE: A Autora (2018)

5.2.2 Teste do MTT

O teste do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina] é um dos testes de avaliação da viabilidade celular mais utilizados devido a sua

sensibilidade de detecção de citotóxicos. A viabilidade mitocondrial e, consequentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT a formazan pela atividade das enzimas desidrogenases mitocondriais (FIGURA 3). Dessa forma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

FIGURA 3 - REAÇÃO DE REDUÇÃO DO MTT A FORMAZAN



FONTE: A Autora (2018)

Para avaliar o potencial citotóxico das frações de lignina, o teste do MTT foi realizado com células HepG2 cultivadas em monocamadas, segundo o protocolo descrito por Mosmann (1983), com algumas modificações.

Células HepG2 (1×10^4 células/tratamento) foram expostas (placa de 96-poços) às diferentes frações de lignina em cinco concentrações diferentes (1,5; 3,12; 6,25; 12,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. Para os controles negativo, solvente e positivo, foram utilizados, respectivamente, meio de cultivo, DMSO 0,25%-v/v e Triton X-100 1%-v/v. Oito poços foram reservados para o controle branco, nos quais células não foram plaqueadas e no ensaio foi utilizado apenas o meio DMEM.

Decorrido as 24 horas de exposição, os tratamentos foram cuidadosamente removidos, os poços foram lavados com PBS e a placa foi incubada com o MTT (0,5 mg/mL) (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*, CAS 298-93-1, Sigma®) por 3 horas. Em seguida, o MTT foi descartado e 100 μL de DMSO foram adicionados em cada poço da placa de cultura, para a dissolução dos cristais de formazan. Os cristais de formazan resultam da atividade enzimática da enzima mitocondrial succinato desidrogenase presente nas células vivas. Após breve agitação, as placas foram

submetidas ao espectrofotômetro de microplacas Epoch™ (filtro de 540 nm), para a realização das medidas espectrofotométricas.

A viabilidade celular foi calculada como segue:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{(\text{absorbância da amostra} - \text{absorbância branco}) \times 100}{(\text{absorbância do controle solvente} - \text{absorbância branco})}$$

5.2.3 Tratamentos para a avaliação do potencial antigenotóxico e genotóxico da lignina

Para avaliar o potencial hepatoprotetor contra danos no DNA (atividade antigenotóxica) das frações de lignina, 5×10^4 células por poço (placa de 24-poços) foram expostas a dois tipos tratamentos distintos:

- (1) Pré-tratamento: as células foram expostas à lignina por 24 horas e, em seguida, o meio foi removido e as células foram expostas a dois agentes genotóxicos: Metil metanosulfonato (MMS) a 0,5 mM dissolvido em meio DMEM por 3 horas; e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 50 μM dissolvido em PBS por 1 hora;
- (2) Tratamento simultâneo: as células foram expostas simultaneamente à lignina e aos genotóxicos por 3 horas ao MMS (0,5 mM) e 1 hora ao H_2O_2 (50 μM).

Além disso, as células HepG2 (5×10^4 células por poço) foram expostas à lignina (25 $\mu\text{g/mL}$) isoladamente por 3 horas para avaliar o potencial genotóxico das frações. Como controle negativo foi utilizado meio DMEM, e como controle positivo, os genotóxicos sem a lignina, nas concentrações acima mencionadas.

O tempo de exposição aos genotóxicos foi definido de acordo com o protocolo do ensaio Cometa de Klingelfus, et al. (2018).

5.2.4 Ensaio Cometa

A versão alcalina (versão padrão) do ensaio Cometa detecta quebras de fita simples (SSB), quebras de fita dupla (DSB), SSB associadas a sítios incompletos de reparo e sítios álcali-lábeis, enquanto que a versão modificada para lesões oxidativas (versão oxidativa) detecta danos no DNA causados por ROS. Para avaliar a capacidade de uma substância de proteger o material genético de lesões detectáveis pelo ensaio Cometa, deve-se fazer o pré-tratamento e o tratamento simultâneo como citados na seção anterior, e avaliar se houve diminuição da cauda de DNA em relação

às células tratadas apenas com os genotóxicos (controle positivo). O protocolo do ensaio Cometa foi elaborado segundo recomendações de Klinge, et al. (2018), com algumas adaptações.

Após os tratamentos, as células foram coletadas por tripsinização e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. Parte do sobrenadante foi descartada, de modo que restasse cerca de 50 µL, nos quais as células foram ressuspensas e 10 µL foram separados para o teste de viabilidade celular com *Trypan Blue*.

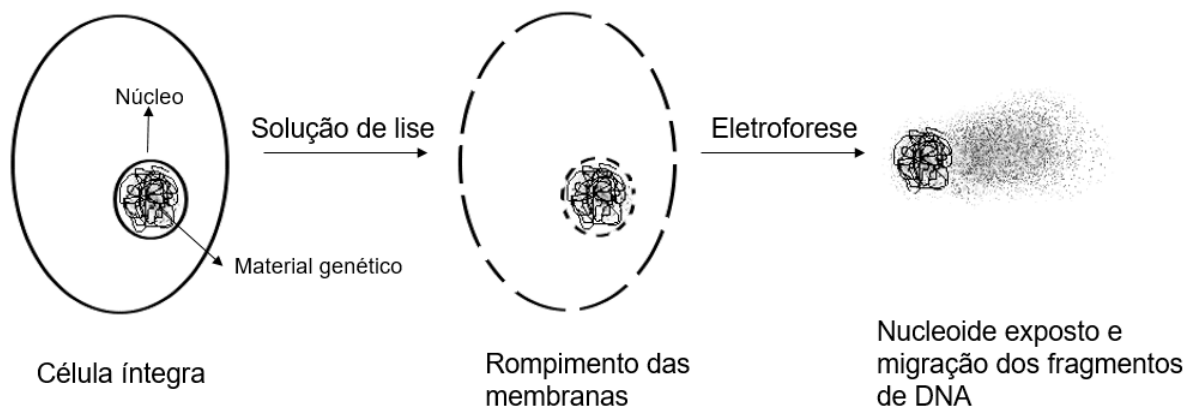
O pellet foi ressuspensado novamente com agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (LMP – *low melting point*) a 37°C e a nova suspensão celular de cada tratamento foi disposta em lâminas previamente cobertas com agarose normal (NMP – *normal melting point*). A agarose LMP permanece em estado líquido na temperatura de 37°C, sendo ideal para a suspensão celular, enquanto que a agarose normal precisa atingir em torno de 85 a 90°C para entrar em fusão, temperaturas que geram instabilidade no DNA. As lâminas foram, então, recobertas por lamínulas e após breve solidificação da agarose a 4°C, as lamínulas foram removidas e as lâminas incubadas em solução de lise (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de tampão Tris-HCL, pH 10, 1% de sarcosinato de sódio com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) por 24 horas.

As lâminas com células tratadas com H₂O₂ passaram pela etapa oxidativa, na qual foi utilizada a enzima hOGG1 (8-hidroxiguanina DNA-glicosilase humana), uma endonuclease que detecta purinas oxidadas, principalmente a 8-oxoguanina, e as cliva do DNA. Essas lâminas foram retiradas da solução de lise e dispostas em uma superfície plana, onde sofreram 3 lavagens de 5 minutos com o tampão da enzima hOGG1 (40 mM HEPES; 0,1 M KCl; 0,5 mM EDTA; 0,2 mg/mL BSA; pH 8). Em seguida, foram adicionados em cada lâmina 50 µL da solução de hOGG1 (0,08 U/lâmina) (*New England Biolabs*). As lâminas foram recobertas por lamínulas e distribuídas em uma câmara úmida coberta com papel alumínio, e mantidas em uma estufa estável com temperatura de 37°C, por 30 minutos. Após isso, as lâminas foram mergulhadas em uma cubeta contendo o tampão da enzima e tiveram suas lamínulas retiradas.

Em seguida, todas as lâminas, tanto da versão alcalina quanto da oxidativa, foram transferidas para a cuba de eletroforese contendo tampão de eletroforese (200 mM EDTA; 10 M NaOH; pH ≥ 13) por 25 minutos e, em seguida, submetidas à eletroforese por 25 minutos (1 V/cm, 300 mA). Decorrido o tempo da corrida de eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em tampão Tris-HCl (pH 7,5), fixadas em

etanol absoluto e acondicionadas a 4°C, até a realização das análises. A FIGURA 4 representa uma célula submetida ao ensaio Cometa, a exposição do nucleóide e a migração dos fragmentos de DNA.

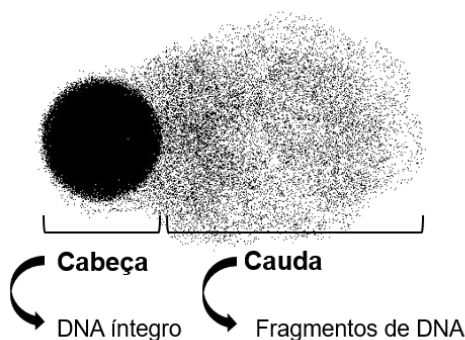
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE CÉLULA SUBMETIDA AO ENSAIO COMETA.



FONTE: A Autora (2018)

As lâminas foram coradas com de solução de brometo de etídio (20 µg/mL) e 100 nucleóides (FIGURA 5) por tratamento foram analisados, ao acaso, com auxílio do microscópio de fluorescência *Axio Imager Z2* (Carl Zeiss) equipado com o programa de análise de imagem *Metafer 4-Monochrome* (Metafer System - Zeiss).

FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE NUCLEOIDE VISUALIZADO APÓS O ENSAIO COMETA



FONTE: A Autora (2018)

Apenas culturas com viabilidade celular maior ou igual a 80% foram utilizadas (método de exclusão do *Trypan Blue*). Os experimentos foram realizados em uma

única repetição técnica por tratamento (1 poço/tratamento) e em triplicata biológica (3 experimentos independentes).

5.2.5 Análise estatística

O teste D'Agostino-Pearson foi utilizado para avaliar a normalidade dos resultados de viabilidade celular obtidos pelo teste do MTT e dos resultados da antigenotoxicidade e genotoxicidade obtidos pelo ensaio Cometa. A viabilidade celular foi avaliada estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney. A antigenotoxicidade e genotoxicidade foram avaliadas estatisticamente pelo teste t não-pareado. Respostas genotóxicas positivas foram consideradas quando observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) das células expostas à lignina em relação ao controle solvente. Atividades antigenotóxicas foram consideradas quando obteve-se redução significativa ($p < 0,05$) em relação aos agentes indutores (MMS ou H_2O_2). Em casos de respostas antigenotóxicas, o potencial de redução de danos em cada tratamento foi determinado pelo cálculo da porcentagem de redução pela seguinte fórmula:

$$\text{Redução de danos (\%)} = \frac{(a-b) \times 100}{(a-c)}$$

(onde: a = número de danos induzidos pelo CP; b = número de danos induzidos por cada tratamento; c = número danos induzidos pelo CN) (Roberto et al., 2016).

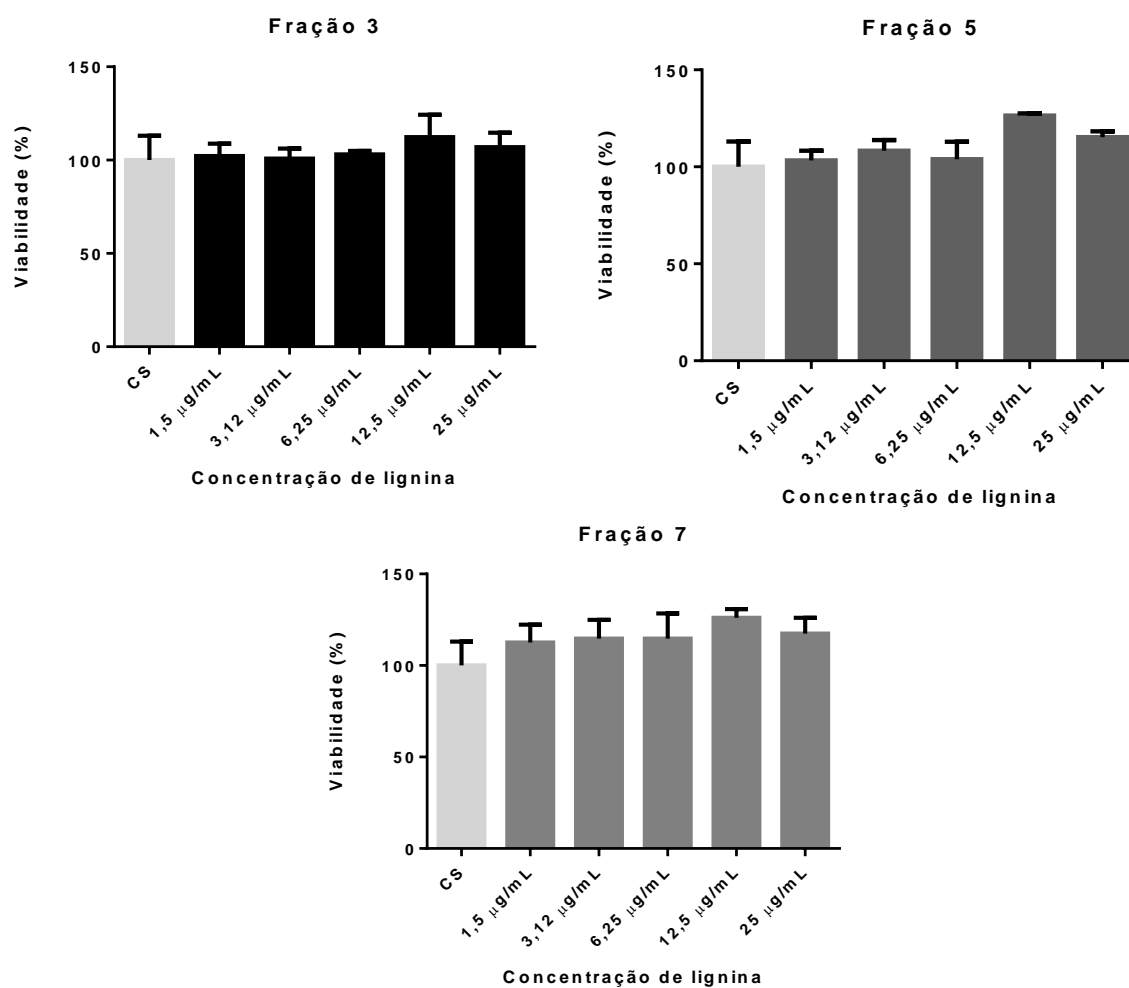
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 TESTE DO MTT

As frações F3, F5 e F7 não apresentaram efeitos citotóxicos em nenhuma das concentrações testadas após 24 horas de tratamento (FIGURA 6). A fração F9 não pôde ser avaliada quanto à citotoxicidade pois as células tratadas com essa fração apresentaram problemas de adesão à placa, o que causou o desprendimento das células durante as lavagens requeridas para a realização do teste.

O controle solvente não apresentou alterações significativas se comparado ao controle negativo, dessa forma, a viabilidade das frações foi calculada em relação ao controle solvente. O controle positivo apresentou 100% de células não viáveis.

FIGURA 6 - GRÁFICOS DOS DADOS DA VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HÉPG2 EXPOSTAS ÀS FRAÇÕES 3, 5 E 7 DE LIGNINA OBTIDOS ATRAVÉS DO TESTE DO MTT DE 24 HORAS.



FONTE: A Autora (2018)

NOTA: CS: Controle solvente (DMSO 0,25%).

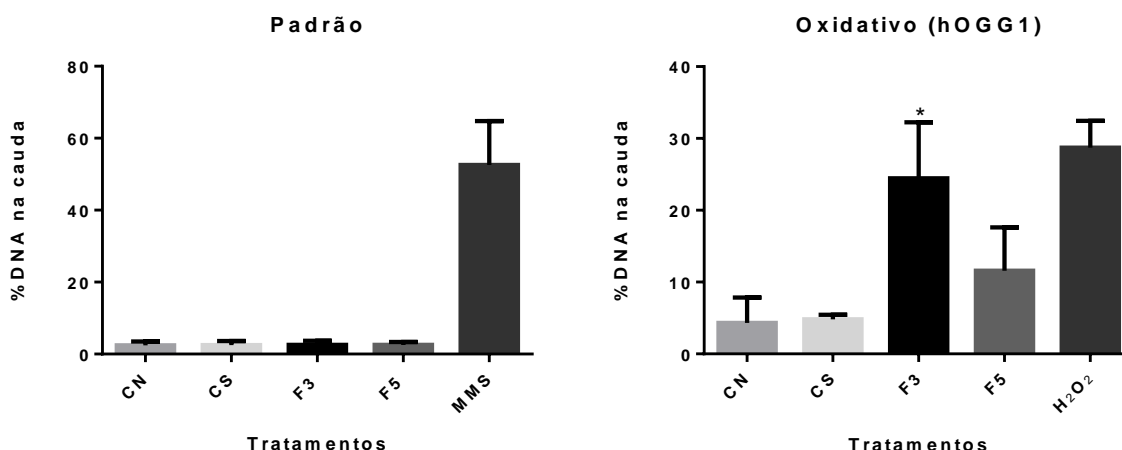
As frações escolhidas para serem utilizadas no ensaio Cometa foram a F3 e a F5, nas três maiores concentrações (25, 12,5 e 6,25 µg/mL) devido à ausência de citotoxicidade e aos dados do ensaio de DPPH cedidos pelo Dr. Washington Luiz Esteves Magalhães, que serão apresentados posteriormente (TABELA 3).

6.2 ENSAIO COMETA

6.2.1 Genotoxicidade

As frações de lignina (F3 e F5) não foram capazes de induzir danos no DNA detectáveis pelo ensaio Cometa na versão alcalina, porém, a fração 3 se mostrou capaz de induzir a oxidação de bases na versão oxidativa (FIGURA 7).

FIGURA 7 - GRÁFICOS DOS DADOS DE GENOTOXICIDADE DAS FRAÇÕES DE LIGNINA (F3 E F5) OBTIDOS PELOS ENSAIOS COMETA PADRÃO E OXIDATIVO (hOGG1) EM CÉLULAS HEPG2.



FONTE: A Autora (2018)

NOTAS: CN: controle negativo; CS: controle solvente (DMSO 0,25%); F3: fração F3 (25 µg/mL); fração F5 (25 µg/mL); *p<0,05.

Alguns tipos de lignina já foram demonstrados como sendo genotóxicos. A lignina não modificada derivada do processo Kraft apresentou efeito genotóxico no DNA de células V79 na versão tradicional do ensaio Cometa, sem adição de enzimas (KOŠÍKOVÁ, et al., 2002). Slamenová e colaboradores (2000) constataram que quatro frações de lignina derivadas de uma lignina inicial obtida pelo fracionamento do hidrolisado de madeira, causaram lesões no DNA incluindo quebras, formação de sítios álcali-lábeis e lesões oxidativas sensíveis a enzima formamido-pirimidina-DNA (FPG). Em ambos os trabalhos, outros tipos de lignina que foram avaliados nas mesmas condições não geraram danos ao DNA, o que ressalta a importância do método de extração desse polímero nas suas propriedades. Os dados estão compilados na TABELA 2.

TABELA 2 – COMPILAÇÃO DE DADOS DE GENOTOXICIDADE DA LIGNINA NA LITERATURA.

Tipo de lignina	Ensaio	Sistema-teste	Enzima para detecção de danos oxidativos	Genotoxicidade	Referência
Lignina derivada de pré-hidrolise de madeira	Ensaio Cometa	Células V79	-	Não	KOŠÍKOVÁ et al. (2002)
Lignina condensada derivada do processo Kraft	Ensaio Cometa	Células V79	-	Não	
Lignina derivada do processo Kraft não modificada	Ensaio Cometa	Células V79	-	Sim	
Lignina 1: hidrossolúvel livre de enxofre derivada de hidrolisado de madeira	Ensaio Cometa	Células de mamífero	FPG	Não	(SLAMENOVÁ et al., 2000)
Lignina 2: derivada da oxidação da lignina 1	Ensaio Cometa	Células de mamífero	FPG	Sim	
Lignina 3: preparada da extração etanólica da lignina 2	Ensaio Cometa	Células de mamífero	FPG	Sim	
Lignina 4: obtida da lignina 3	Ensaio Cometa	Células de mamífero	FPG	Sim	
Lignina 5: extraída da fração 2 com éter dietílico	Ensaio Cometa	Células de mamífero	FPG	Sim	

FONTE: A Autora (2018).

NOTA: As frações de lignina que apresentaram genotoxicidade estão destacadas em cinza.

O efeito oxidante do DNA das frações de lignina é, contudo, um resultado contraditório aos dados cedidos pelo Dr. Washington Luiz Esteves Magalhães, obtidos pelo teste de DPPH realizado com as mesmas frações de lignina (dados não publicados). Nesse teste, as quatro frações (F3, F5, F7 e F9) demonstraram um alto poder antioxidante (TABELA 3).

TABELA 3 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FRAÇÕES DE LIGNINA F9, F7, F5 E F3 QUANTIFICADAS PELO ENSAIO DPPH.

	IC50 (mg de lignina/L de DPPH 60 µM)
Fração	Média ± DP
9	9,889987 ± 0,004008
7	8,914852 ± 0,007559
5	7,511302 ± 0,00112
3	7,090927 ± 0,005393

FONTE: Dr. Washington Luiz Esteves Magalhães (dados não publicados)

NOTAS: IC₅₀ (concentração inibitória): concentração de antioxidante necessária para que haja 50% de DPPH remanescente no sistema. DP: desvio padrão da média.

Há duas possíveis explicações para esse fenômeno. Primeiro, os testes de reatividade química, como o DPPH, nem sempre predizem os efeitos em um sistema biológico. Esses ensaios só avaliam a atividade antioxidante no sistema de reação testado, portanto, sua relevância para um sistema biológico é incerta. Assim, é necessário utilizar mais de um tipo de ensaio para medir as atividades antioxidantes, e incluir pelo menos um que tenha relevância biológica (BADARINATH et al., 2010). Além disso, o ensaio do DPPH é muito sensível ao ambiente da reação, como por exemplo ao pH, ao oxigênio dissolvido, a exposição à luz, ao solvente, entre outros, e alterações nessas variáveis podem levar a resultados superestimam ou sobrestimam a capacidade antioxidante de um composto (SCHAICH; TIAN; XIE, 2015).

Outra explicação possível é que a lignina é um agente pró e antioxidante, dependendo das condições de estudo. A lignina é um composto fenólico e, na literatura, há evidências que esses compostos podem apresentar efeitos antioxidantes, antimutagênicos e anticarcinogênicos em certas condições e efeitos pró-oxidantes e citotóxicos em outras (DECKER, 1997; SAKIHAMA et al., 2002; IWASAKI et al., 2011; ZHOU; ELIAS, 2013). Isso depende do potencial de redução de compostos como metais, do comportamento quelante, do pH e de características de solubilidade (SAKIHAMA et al., 2002). Essas substâncias têm o potencial de agir como pró-oxidantes em sistemas contendo metais redox ativos. Na presença de O₂, metais de transição como cobre (Cu) e ferro (Fe) podem levar à formação de ROS e outros radicais orgânicos que podem danificar o DNA, lipídios e outras biomoléculas (SAKIHAMA et al., 2002). O cobre é um importante íon metálico presente na cromatina e está intimamente associado com bases de DNA, particularmente com a guanina (IWASAKI et al., 2011). A interação de compostos fenólicos com cobre associado ao

DNA pode resultar em um espectro de lesões no material genético, incluindo oxidação de bases, quebras de cadeia e formação de adutos de DNA (SAKIHAMA et al., 2002). Antioxidantes, incluindo quercetina, curcumina, catequinas do chá, salsolinol, e resveratrol, foram relatados como indutores de peroxidação lipídica e/ou dano ao DNA na presença de íons cúpricos. Nesta reação, Cu^{2+} é reduzido a Cu^+ por compostos fenólicos e a re-oxidação de Cu^+ a Cu^{2+} é acompanhada pela formação de ROS (IWASAKI et al., 2011).

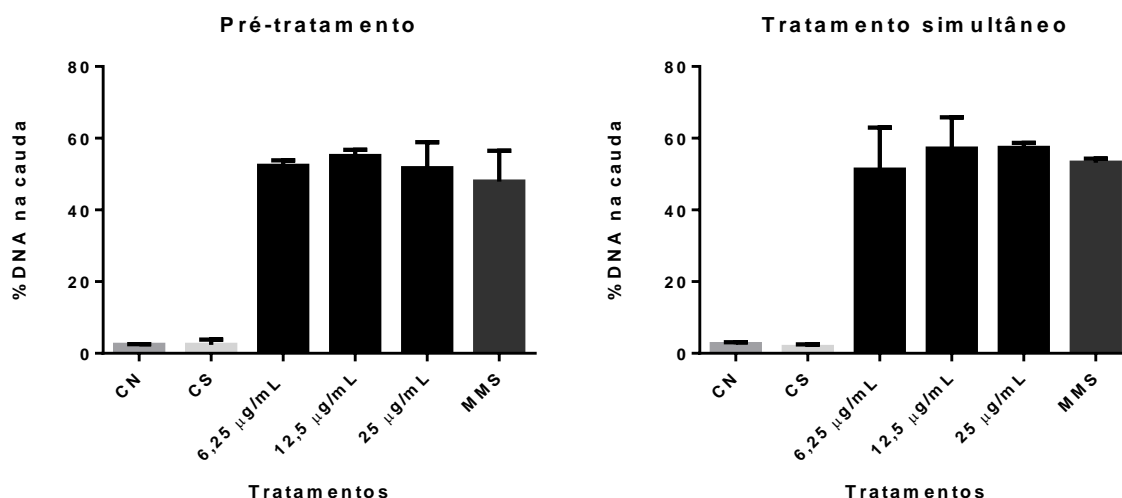
Iwasaki e colaboradores (2011) avaliaram dez compostos fenólicos, incluindo ácido cafeico, epicatequina e quercetina, quanto a suas atividades antioxidante e pró-oxidante. Foi utilizado o ensaio do DPPH, em que todos os compostos testados, exceto o ácido quínico, apresentaram capacidade antioxidante. Para avaliar a atividade pró-oxidante, a 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), metabólito do dano oxidativo do DNA, foi medida em DNA de bezerro. Na presença de íons cúpricos, a 8-OHdG foi efetivamente formada, enquanto que, na ausência de Cu^{2+} , não houve formação do nucleosídeo oxidado. O efeito de oxidação do DNA não foi observado para o ácido quínico, o ácido ferúlico e resveratrol.

Novos ensaios devem ser realizados para avaliar o mecanismo de genotoxicidade da lignina a fim de elucidar por que as frações apresentaram resultados discordantes no teste do DPPH e no ensaio Cometa, e, portanto, confirmar ou refutar as hipóteses acima mencionadas.

6.2.2 Antigenotoxicidade

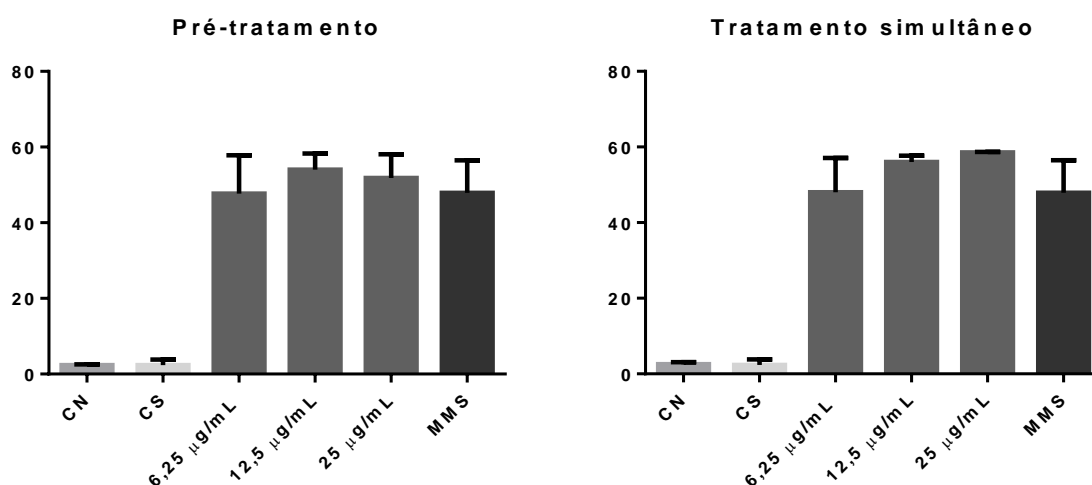
As frações de lignina F3 (FIGURA 8) e F5 (FIGURA 9) não foram capazes de proteger o DNA contra danos induzidos por agentes alquilantes (MMS) em nenhuma das concentrações testadas no pré-tratamento e no tratamento simultâneo.

FIGURA 8 - GRÁFICOS DOS RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DE ANTIGENOTOXICIDADE DA FRAÇÃO 3 (F3) NA VERSÃO PADRÃO DO ENSAIO COMETA EM CÉLULAS HEPG2



FONTE: A Autora (2018)

FIGURA 9 - GRÁFICOS DOS RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DE ANTIGENOTOXICIDADE DA FRAÇÃO 5 (F5) NA VERSÃO PADRÃO DO ENSAIO COMETA EM CÉLULAS HEPG2



FONTE: A Autora (2018)

Os resultados obtidos no ensaio Cometa oxidativo não foram representados devido à baixa qualidade das lâminas (menos de 100 nucleoides por tratamento), entretanto, de forma geral, não houve redução dos danos causados pelo H_2O_2 .

Os resultados obtidos vão em desacordo com outros estudos de antigenotoxicidade da lignina na literatura (SLAMEŇOVÁ et al., 1999; KOŠÍKOVÁ et al., 2002; LÁBAJ; SLAMEŇOVÁ; KOŠÍKOVÁ, 2003; LÁBAJ, et al., 2004; LÁBAJ, et al., 2007; NAIK; ROZMAN; BHAT, 2013), contudo, há de se destacar que as células e os métodos de extração da lignina foram diferentes dos utilizados aqui (ver TABELA

1). Além disso, o MMS não foi utilizado em nenhum dos estudos, portanto não há dados sobre a proteção ao DNA contra danos causados por esse agente alquilante. O H_2O_2 foi utilizado nos estudos de Slameňová et al. (1999), Košíková et al. (2002), Lábaj, et al. (2004) e Lábaj et al. (2007) porém, esses pesquisadores fizeram a exposição ao peróxido por 5 minutos diretamente na lâmina do Cometa, após solidificação da agarose LMP, enquanto que no presente estudo, a exposição foi feita por 1 hora no poço. Além disso, enquanto em alguns estudos não foram utilizadas enzimas para a detecção de danos oxidativos na exposição ao peróxido (LÁBAJ, et al., 2007, KOŠÍKOVÁ et al., 2002), outros utilizaram as enzimas endonuclease III (ENDOIII) e FPG para detecção de danos oxidativos (SLAMENŇOVÁ et al., 1999; LÁBAJ, et al., 2004), as quais possuem uma especificidade menor do que a hOGG1, utilizada no presente estudo, e, portanto, identificam uma variedade de danos, ao contrário da hOGG1, a qual detecta especificamente a 8-oxoguanina (SMITH; O'DONOVAN; MARTIN, 2006). Assim, é possível que ocorra uma via de oxidação não detectável pela hOGG1. As diferenças entre a metodologia empregada nos estudos de antigenotoxicidade da lignina na literatura e a metodologia empregada no presente trabalho é, possivelmente, a causa da divergência entre os resultados obtidos.

7 CONCLUSÃO

A lignina é um composto que possui atividades antioxidantes bem documentadas na literatura. Dessa forma, a hipótese inicial do presente estudo era que esse polímero pudesse ser capaz de proteger o DNA de danos oxidativos devido a sua capacidade de sequestro de radicais livres. Contudo, os resultados de antigenotoxicidade não demonstraram capacidade protetora das frações de lignina testadas (F3 e F5) contra danos no DNA causados por agentes oxidantes, bem como agentes alquilantes. Ao contrário, a fração de lignina F3 se mostrou genotóxica, atuando por um modo de ação genotóxico oxidativo. Esses resultados não são condizentes com dados do teste DPPH realizado com as mesmas frações, nos quais apresentaram um alto poder antioxidante. O DPPH é um teste de reatividade química, o qual não aborda reações e processos celulares, e dessa forma, um efeito antioxidante encontrado nesse ensaio não necessariamente pode ser aplicado a um sistema biológico. Além disso, a lignina é um composto fenólico, e esses compostos podem possuir atividade pró-oxidante ou antioxidante dependendo de condições

como o pH e presença de íons cúpricos. Em suma, a genotoxicidade da fração de lignina F3 alerta quanto ao potencial de causar danos à saúde humana, requerendo avaliações adicionais de segurança toxicológica para uso em produtos (*e.g.*, alimentos ou cosméticos) como agente antioxidantes (dados do teste do DPPH).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEN, D. P.; FOGEL, A.; PLOTKIN, S.; DAMJANOV, I.; KNOWLES, B. B. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. **Nature**, v. 282, n. 5739, p. 615-616, 1979.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTE, P. **Molecular Biology of The Cell**. 7. ed. Nova York: Garland Science; 2014.
- AMKISS, S.; DALLOUH, A.; IDAOMAR, M.; AMKISS, B. Genotoxicity and anti-genotoxicity of fennel plant (*Foeniculum vulgare* Mill) fruit extracts using the somatic mutation and recombination test (SMART). **African Journal of Food Science**, v. 7, n. 8, p. 193–197, 2013.
- ATHINARAYANAN, J.; PERIASAMY, V. S.; QASEM, A. A.; ALSHATWI, A. A. Borassus flabellifer biomass lignin: Isolation and characterization of its antioxidant and cytotoxic properties. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 10, p. 89–96, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352554118300925>>.
- BADARINATH, A. V.; RAO, K. M.; CHETTY, C. M. S.; et al. A review on in –vitro anti oxidant methods comparisions, correlations and considerations. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 2, p. 1276–1285, 2010.
- BARAPATRE, A.; MEENA, A. S.; MEKALA, S.; DAS, A.; JHA, H. In vitro evaluation of antioxidant and cytotoxic activities of lignin fractions extracted from *Acacia nilotica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 443–453, 2016. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813016301106>>.
- BEZERRA, D. P.; MILITÃO, G. C. G.; DE MORAIS, M. C.; DE SOUSA, D. P. The dual antioxidant/prooxidant effect of eugenol and its action in cancer development and treatment. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1–15, 2017.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. LIGNIN BIOSYNTHESIS. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 519–546, 2003. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>> .
- BOUVARD, V.; BAAN, R.; STRAIF, K.; et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 4, p. 321–322, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204509700968>>. .
- CARNEY, E. W.; SETTIVARI, R. Predictive Toxicology. **A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development**. p.777–806, 2013. Elsevier. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123878151000332>>.
- CASTELL, J. V et al. Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 2, n. 2, p. 183–212, 2006.

CHATTERJEE, N.; WALKER, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 58, n. 5, p. 235–263, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28485537>>.

CRISTÓBAL-LUNA, J. M.; ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, I.; MADRIGAL-BUJADAR, E.; CHAMORRO-CEVALLOS, G. Grapefruit and its biomedical, antigenotoxic and chemopreventive properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 112, p. 224–234, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.038>>. .

DECKER, E. A. Phenolics: Prooxidants or Antioxidants? **Nutrition Reviews**, v. 55, n. 11, p. 396–397, 1997.

DE FLORA, S.; FERGUSON, L. R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 591, n. 1–2, p. 8–15, 2005.

DIZHBITE, T.; TELYSHEVA, G.; JURKJANE, V.; VIESTURS, U. Characterization of the radical scavenging activity of lignins - Natural antioxidants. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 3, p. 309–317, 2004.

DONATO, M.; JOVER, R.; GÓMEZ-LECHÓN, M. Hepatic Cell Lines for Drug Hepatotoxicity Testing: Limitations and Strategies to Upgrade their Metabolic Competence by Gene Engineering. **Current Drug Metabolism**, v. 14, n. 9, p. 946–968, 2013.

FERNÁNDEZ-BEDMAR, Z.; ANTER, J.; ALONSO MORAGA, Á. Anti/genotoxic, longevity inductive, cytotoxic, and clastogenic-related bioactivities of tomato andlycopene. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 00, n. 00, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29569272>><<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29569272>>

FIGUEIREDO, P.; LINTINEN, K.; HIRVONEN, J. T.; KOSTIAINEN, M. A.; SANTOS, H. A. Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. **Progress in Materials Science**, v. 93, p. 233–269, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2017.12.001>>. .

IWASAKI, Y. et al. Effect of interaction between phenolic compounds and copper ion on antioxidant and pro-oxidant activities. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 7, p. 1320–1327, 2011.

KALOGERIS, T.; BAO, Y.; KORTHUIS, R. J. Mitochondrial reactive oxygen species: A double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. **Redox Biology**, v. 2, p. 702–714, 2014. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231714000718>>.

KLINGELFUS, T.; DISNER, G. R.; VOIGT, C. L.; et al. Nanomaterials induce DNA-protein crosslink and DNA oxidation: A mechanistic study with RTG-2 fish cell line and Comet assay modifications. **Chemosphere**, v. 215, p. 703–709, 2019.

Pergamon. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653518319799?via%3Dihub>>.

KOŠÍKOVÁ, B.; SLAMEŇOVÁ, D.; MIKULÁŠOVÁ, M.; HORVÁTHOVÁ, E.; LÁBAJ, J. Reduction of carcinogenesis by bio-based lignin derivatives. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, n. 2, p. 153–159, 2002.

LÁBAJ, J. et al. Lignin-stimulated reduction of oxidative DNA lesions in testicular cells and lymphocytes of Sprague-Dawley rats in vitro and ex vivo. **Nutrition and Cancer**, v. 50, n. 2, p. 198–205, 2004.

LÁBAJ, J.; SLAMEŇOVÁ, D.; KOŠÍKOVÁ, B. Reduction of Genotoxic Effects of the Carcinogen N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine by Dietary Lignin in Mammalian Cells Cultured In Vitro. **Nutrition and Cancer**, v. 47, n. 1, p. 95–103, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14769543>>.

LÁBAJ, J.; SLAMEŇOVÁ, D.; LAZAROVÁ, M.; KOŠÍKOVÁ, B. Induction of DNA-lesions in freshly isolated rat hepatocytes by different genotoxins and their reduction by lignin given either as a dietary component or in in vitro conditions. **Nutrition and Cancer**, v. 57, n. 2, p. 209–215, 2007. Taylor & Francis Group. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01635580701277643>>.

LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L. Towards Biobased Aromatic Polymers from Lignins. **Biodegradable and Biobased Polymers for Environmental and Biomedical Applications**. p.385–436, 2016. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/9781119117360.ch11>>.

LEMES, S. R.; CHAVES, D. A.; DA SILVA JÚNIOR, N. J.; et al. Antigenotoxicity protection of Carapa guianensis oil against mitomycin C and cyclophosphamide in mouse bone marrow. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 89, n. 3, p. 2043–2051, 2017.

LOURENÇON, T. V. et al. Hardwood and softwood kraft lignins fractionation by simple sequential acid precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 154, p. 82–88, 2015.

MAKHUVELE, R.; MATSHOGA, R. G.; ANTONISSEN, R.; et al. Genotoxicity and Antigenotoxicity of selected South African indigenous plants. **South African Journal of Botany**, v. 114, p. 89–99, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629917310645>>.

MARTÍNEZ, V.; MITJANS, M.; VINARDELL, M. Pharmacological Applications of Lignins and Lignins Related Compounds: An Overview. **Current Organic Chemistry**, v. 16, n. 16, p. 1863–1870, 2012. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1385-2728&volume=16&issue=16&spage=1863>>. .

MIKULÁŠOVÁ, M.; KOŠÍKOVÁ, B. Modulation of mutagenicity of various mutagens by lignin derivatives. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 535, n. 2, p. 171–180, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>>.

NAIK, P.; ROZMAN, H. D.; BHAT, R. Genoprotective effects of lignin isolated from oil palm black liquor waste. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 1, p. 135–141, 2013.

PODEIN, R. J.; HERNKE, M. T.; FORTNEY, L. W.; RAKEL, D. P. Sustainability, Synthetic Chemicals, and Human Exposure. **EXPLORE: The Journal of Science and Healing**, v. 6, n. 3, p. 186–188, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550830710000443>>. .

POIRIER, M. C. Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 8, p. 630–637, 2004.

PRAPHASAWAT, R.; MUNKONG, N. Anti-Genotoxicity Evaluation of Cratoxylum Formosum Dyer Leaves by Comet Assay and Micronucleus Test. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 6, p. 1475–1478, 2017.

RAVANAT, J. L.; DOUKI, T. UV and ionizing radiations induced DNA damage, differences and similarities. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 128, p. 92–102, 2016. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2016.07.007>>. .

ROBERTO, M. M.; MATSUMOTO, S. T.; JAMAL, C. M.; MALASPINA, O.; MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and *Baccharis dracunculifolia*, by in vitro study with HTC cells. **Toxicology in Vitro**, v. 33, p. 9–15, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2016.02.005>>. .

SAKIHAMA, Y. et al. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology**, v. 177, n. 1, p. 67–80, 2002.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 782–796, 2015.

SCHRADER, T. J. MUTAGENS. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. p. 4059–4067, 2003. Elsevier. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B012227055X008178>>.

SLAMEŇOVÁ, D. et al. Oxidative/antioxidative effects of different lignin preparations on DNA in hamster V79 cells. **Neoplasma**, v. 47, n. 6, p. 349–353, 2000.

SLAMEŇOVÁ, D.; HORVÁTHOVÁ, E.; KOŠÍKOVÁ, B.; RUŽEKOVÁ, L.; LÁBAJ, J. Detection of lignin biopolymer- and vitamin E-stimulated reduction of DNA strand breaks in H₂O₂- and MNNG-treated mammalian cells by the comet assay. **Nutrition and Cancer**, v. 33, n. 1, p. 88–94, 1999. Taylor & Francis Group. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01635589909514753>>.

SMITH, C. C.; O'DONOVAN, M. R.; MARTIN, E. A. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. **Mutagenesis**, v. 21, n. 3, p. 185–190, 2006.

SUNTHORNVARABHAS, J.; LIENGPRAYOON, S.; SUWONSICHON, T. Antimicrobial kinetic activities of lignin from sugarcane bagasse for textile product. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 857–861, 2017. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669017306672>>.

TEDESCO, I.; RUSSO, M.; RUSSO, P.; et al. Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, n. 2, p. 114–119, 2000. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286399000807?via%3Dihub>>.

UGARTONDO, V.; MITJANS, M.; VINARDELL, M. P. Applicability of lignins from different sources as antioxidants based on the protective effects on lipid peroxidation induced by oxygen radicals. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 2, p. 184–187, 2009.

UGARTONDO, V.; MITJANS, M.; VINARDELL, M. P. Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6683–6687, 2008.

VINARDELL, M. P.; MITJANS, M. Lignins and their derivatives with beneficial effects on human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017.

VINARDELL, M. P.; UGARTONDO, V.; MITJANS, M. Potential applications of antioxidant lignins from different sources. **Industrial Crops and Products**, v. 27, n. 2, p. 220–223, 2008.

WANG, Q. et al. Characterization of two water-soluble lignin metabolites with antiproliferative activities from *Inonotus obliquus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, n. 20120731, p. 507–514, 2015.

WATKINS, D.; NURUDDIN, M.; HOSUR, M.; TCHERBI-NARTEH, A.; JEELANI, S. Extraction and characterization of lignin from different biomass resources. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 4, n. 1, p. 26–32, 2015. Korea Institute of Oriental Medicine. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmrt.2014.10.009>>.

ZAREV, Y.; FOUBERT, K.; LUCIA DE ALMEIDA, V.; et al. Antigenotoxic prenylated flavonoids from stem bark of *Erythrina latissima*. **Phytochemistry**, v. 141, p. 140–146, 2017. Pergamon. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942217302236>>.

ZHOU, L.; ELIAS, R. J. Antioxidant and pro-oxidant activity of (-)-epigallocatechin-3-gallate in food emulsions: Influence of pH and phenolic concentration. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 1503–1509, 2013.

ZOR, M.; AYDIN, S.; GÜNER, N. D.; BAŞARAN, N.; BAŞARAN, A. A. Antigenotoxic properties of *Paliurus spina-christi* Mill fruits and their active compounds. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2017.